



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 02 569 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 9/10**  
A 61 K 38/45  
// (C12N 9/10, C12R  
1:145)

⑦ Aktenzeichen: 198 02 569.6  
② Anmeldetag: 23. 1. 98  
④ Offenlegungstag: 9. 9. 99

**DE 198 02 569 A 1**

⑦ Anmelder:  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79098  
Freiburg, DE  
  
⑦ Vertreter:  
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

⑦ Erfinder:  
Aktories, Klaus, Prof. Dr.Dr., 79189 Bad Krozingen,  
DE; Hofmann, Fred, Dr., 79110 Freiburg, DE  
  
⑤ Entgegenhaltungen:  
Datenbank Swisspat AC J 40884,  
Gene, 161 (1995), S. 57-61;  
EMBL-Genbank AC X82638;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤ Toxikologisch aktive Fragmente des lethalen Toxins von Clostridium sordellii und deren Verwendung in Immuntoxinen  
  
⑦ Offenbart werden biologisch aktive Fragmente des lethalen Toxins von Clostridium und Immuntoxine, die diese Fragmente und eine Zellbindungskomponente aufweisen.

**DE 198 02 569 A 1**

## Beschreibung

Bei den verschiedensten Therapieansätzen werden unterschiedliche Toxine eingesetzt. Bei den Toxinen handelt es sich um Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen oder Pflanzen, die eine Giftwirkung auf den Organismus von Säugetieren und insbesondere des Menschen haben. Von bestimmten lebenden Bakterien werden die sogenannten Exotoxine, wie beispielsweise Cholera-, Diphtherie-, Tetanus- oder Gasbrandtoxin abgesondert.

Die für die Therapie einsetzbaren Exotoxine wirken innerhalb der Zelle. Üblicherweise binden die Toxine zunächst an Rezeptoren an der Zelloberfläche, werden dann durch Endozytose aufgenommen und durchqueren eine intrazelluläre Membran, um das Zytoplasma in der Zelle zu erreichen. Im Zytoplasma rufen die Toxine dann die zytotoxischen Effekte hervor. Häufig stören die Toxine in dem Zytoplasma essentielle Stoffwechselwege. Die Störung tritt häufig bei der Proteinsynthese auf. Wenn Stoffwechselwege betroffen sind, die in jeder Zelle ablaufen, muß gewährleistet sein, daß bei der therapeutischen Anwendung das Toxin möglichst nur in die gewünschte Zielzelle gelangt, da anderenfalls die unerwünschten Nebenreaktionen überhand nehmen würden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Fragment eines bakteriellen Exotoxins, nämlich des sogenannten lethalen Toxins (LT), das von Clostridium sordellii gebildet wird. Das lethale Toxin von Clostridium sordellii gehört zu der Familie der großen Clostridienzytotoxine, die morphologische Veränderungen in Zelllinien hervorrufen. Diese gehen einher mit einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts.

Das lethale Toxin ist eine Glucosyltransferase, die UDP-Glucose als Co-Substrat zur Modifikation von GTPasen mit niedrigem Molekulargewicht verwendet. LT modifiziert selektiv Rac und Rap sowie Ras. Ras ist der Prototyp einer Unterfamilie der Superfamilie der GTPasen mit niedrigem Molekulargewicht. LT modifiziert und inaktiviert Ras durch Glycosylierung eines essentiellen Threoninrestes (35). Durch die Glycosylierung wird Ras inaktiviert, was zu einer Inhibition des EGF (Epidermal Growth Factor) stimulierten MAP-Kinaseweges führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein biologisch aktives Fragment des lethalen Toxins von Clostridium, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 oder eine hierzu homologe Sequenz aufweist, wobei die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 80% beträgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das biologisch aktive Fragment des lethalen Toxins die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 auf.

M	N	L	V	N	K	A	Q	L	Q	K	M	V	Y	V	K	
F	R	I	Q	E	D	E	Y	V	V	I	L	N	A	L	E	
E	K	H	D	M	S	E	S	S	V	E	E	N	Y	L	K	5
L	Y	N	I	N	N	L	T	D	N	Y	L	K	Y	L	K	
K	S	G	R	N	K	A	L	K	K	F	K	E	Y	E	T	
M	E	V	L	E	L	K	N	N	S	L	T	P	V	E	K	
N	L	H	F	I	W	I	G	N	Q	I	N	D	T	A	I	10
N	Y	I	N	Q	W	K	D	V	N	S	D	Y	T	V	K	
V	F	Y	D	S	N	A	F	L	I	N	T	L	K	K	T	
I	V	E	S	A	T	N	N	T	K	E	S	F	R	E	N	
L	N	D	P	E	F	D	Y	N	L	F	Y	R	K	R	M	
E	I	I	Y	D	K	Q	K	H	F	I	D	Y	Y	K	S	15
Q	I	E	E	N	P	E	F	I	I	D	N	I	I	K	T	
Y	L	S	N	E	Y	S	K	D	L	E	A	L	N	K	Y	
I	E	S	L	N	K	I	T	A	N	N	G	N	Y	I		20
R	N	L	E	K	F	A	D	E	D	L	V	R	L	Y	N	
Q	E	L	V	E	R	W	N	L	A	A	S	D	I	L		
R	I	S	M	L	K	E	D	G	G	V	Y	S	I	N	K	
M	L	P	G	I	Q	P	D	L	F	K	S	L	N	K	A	
D	S	I	T	E	T	S	W	E	M	I	K	L	E	A	I	25
M	K	Y	K	E	Y	I	P	G	Y	T	S	K	N	F	D	
M	L	D	E	E	V	Q	R	S	F	E	S	D	A	L	S	
K	S	D	K	S	E	I	F	L	P	A	N	S	V	I	N	
S	P	L	E	V	K	I	A	F	A	N	N	S	D	L	V	
Q	A	L	I	S	L	K	D	S	Y	C	S	D	L	N	I	30
N	Q	I	K	N	R	Y	K	I	L	N	D	N	L	N	P	
S	I	N	E	G	T	D	F	N	T	N	M	K	I	F	S	
D	K	L	A	S	I	S	N	E	D	F	A	P	D	V	R	
K	I	T	N	Y	L	K	V	G	F	A	P	D	V	R	S	35
T	I	N	L	S	G	P	G	V	Y	T	G	A	Y	Q	D	
E	L	M	F	K	D	N	S	T	N	I	H	L	L	E	P	
E	L	R	N	F	E	F	P	K	T	K	I	S	Q	A	T	
S	Q	E	I	T	S	L	W	S	F	N	Q	A	R	A	K	40
E	D		E	E	Y	K	K	G	Y	F	E	G	A	L	G	

Darüber hinaus kann das biologisch aktive Fragment noch am N- und/oder C-Terminus weitere Sequenzen aufweisen. Bevorzugt ist jedoch, wenn das Fragment keine weiteren Sequenzen aufweist, die von Clostridium-DNA abgeleitet sind. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Abwandlungen und Variationen des bevorzugt eingesetzten Fragments des lethalen Toxins. Die beanspruchten Fragmente weisen eine Homologie zu der in Seq.-ID-Nr. 1 angegebenen Aminosäuresequenz von wenigstens 80% auf. Eine Homologie von 80% bedeutet, daß jeweils 80% der Aminosäuren an der jeweiligen Position der angegebenen Sequenz entsprechen, wohingegen 20% der Aminosäuren unterschiedlich sein können. Die essentiellen Bereiche des Proteinfragments müssen dabei unverändert bleiben, jedoch ist es möglich, daß Aminosäuren in den nicht biologisch aktiven Bereichen ausgetauscht werden können, wobei bevorzugt die Aminosäuren durch ähnliche Aminosäuren ausgetauscht werden. Die Ähnlichkeit wird bedingt durch die Seitenketten, insbesondere durch die Polarität und die Ladung der Seitenketten.

Die erfindungsgemäßen Fragmente können bevorzugterweise in Immuntoxinen Verwendung finden. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung daher Immuntoxine, die erfindungsgemäß ein biologisch aktives Fragment und eine Zellbindungskomponente aufweisen.

Die Zellbindungskomponente kann ein Antikörper oder ein Teil davon (variable Regionen) sein, der spezifisch an eine Zielzelle bindet. Alternativ hierzu kann die Zellbindungskomponente ein Ligand sein, der spezifisch an einen Rezeptor der Zielzelle binden kann.

Bei den Zielzellen handelt es sich bevorzugt um Tumorzellen.

Als weiteren Bereich können die erfindungsgemäßen Immuntoxine ein Transportsystem oder einen Translokationsbereich aufweisen, der es ermöglicht, daß das Toxin in das Zytoplasma der Zelle eingebracht wird. Erfindungsgemäß wird besonders das Transportsystem des Pseudomonas Exotoxin A oder des Diphtherietoxins bevorzugt eingesetzt. In einer anderen bevorzugt eingesetzten Ausführungsform wird das Transportsystem des C2-Toxin bevorzugt eingesetzt, das in der deutschen Patentanmeldung 197 35 105,0 näher beschrieben ist. Das C2-Transportsystem beinhaltet die N-terminale C21-Domäne des C2-Toxins von *C. botulinum* als Interaktionsdomäne.

Die vorliegende Erfindung betrifft also die Verwendung eines erfindungsgemäßen Fragments als Toxin, das zur Abtötung spezifischer Zellen eingesetzt werden kann.

Die erfindungsgemäßen Immunotoxine weisen also in bevorzugter Ausführungsform wenigstens drei Bereiche auf. Der erste Bereich ist der Zellbindungsbereich. Mit Hilfe des Zellbindungsbereiches dockt das Immunotoxin an die Zielzelle an. Bei den natürlich vorkommenden Immunotoxinen bindet dieser Bereich üblicherweise an einen Rezeptor der Zielzelle. Beim Pseudomonas Exotoxin A bindet dieser Bereich beispielsweise an den  $\alpha 2$ -Makroglobulinrezeptor. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann es sich bei der Zellbindungskomponente um einen Antikörper oder ein Antikörperfragment handeln, das an eine bestimmte Struktur an der Zelloberfläche bindet. Es ist nicht erforderlich, daß der gesamte Antikörper beim Immunotoxin vorhanden ist. Ausreichend können beispielsweise die Fv-Fragmente sein, die die variablen Regionen aus den Fab-Fragmenten eines Antikörpers darstellen.

Alternativ hierzu kann die Zellbindungskomponente ein Ligand sein, der an einen Rezeptor auf der Zelle bindet. Liganden können beispielsweise Zytokine wie Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktor usw. sein, die an die hierfür spezifischen Rezeptoren binden. Da üblicherweise eine möglichst hohe Zellspezifität für die Immunotoxine gewünscht wird, werden erfindungsgemäß bevorzugt solche Liganden eingesetzt, die an Rezeptoren binden, die sich nur oder zumindest überwiegend auf den Zielzellen finden.

Das erfindungsgemäße Fragment des lethalen Toxins kann besonders vorteilhaft bei Tumoren verwendet werden, da das Toxinfragment zellleigene Enzyme inaktiviert, die bei der Krebsbildung außer Kontrolle geraten sind. Die Ras-Gene gehören zu den Onkogenen und werden besonders stark in Tumorzellen exprimiert. Wenn also die aufgrund des Tumors übermäßig stark exprimierten Ras-Genprodukte wieder inaktiviert werden können, ermöglicht diese eine effektive Tumorthherapie.

Gegenüber dem unveränderten lethalen Toxin weisen die erfindungsgemäßen Fragmente den Vorteil auf, daß sie kleiner sind. Kleinere Proteine können aber von den Zielzellen leichter aufgenommen werden und die toxische Wirkung kann sich daher besser im Zytosol der Zielzelle entfalten.

Bei der Therapie mit Immunotoxinen hat sich die Bildung von Antikörpern gegen das Toxin als Problem herausgestellt. Da erfindungsgemäß nur ein Fragment des Holotoxins eingesetzt wird, ist die Gefahr der Bildung von (neutralisierenden) Antikörpern verringert.

Überraschenderweise wurde auch herausgefunden, daß die erfindungsgemäßen Toxinfragmente eine höhere Aktivität aufweisen als das unveränderte Holotoxin.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgend beschriebenen Beispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion wurden zwei Fragmente des lethalen Toxins von *C. sordellii*, Stamm 6018 amplifiziert. Einmal wurde das erfindungsgemäße Fragment mit den Aminosäuren 1 bis 546. Weiterhin wurde als Vergleich das Fragment mit den Aminosäuren 1 bis 517 durch Verkürzung des erstgenannten Fragments hergestellt.

Die Amplifikation der Fragmente wurde mit Hilfe des PCR-Systems 2400 von Perkin Elmer gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt, wobei das Primerpaar CS1C/CS1N eingesetzt wurde. Die Primer hatten folgende Sequenzen:

5' - AGATCTATGAACTTAGTTAACAAGCC - 3'

Seq. - ID-Nr. 2

5' - GGATCCGAACCTTATCCTAAATCC - 3'

Seq. - ID-Nr. 3

Die Reaktion wurde mit 300 nmol Primern, 250 ng chromosomaler DNA in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l in 30 Zyklen durchgeführt (Denaturierung, 94°C, 10 Sek.; Annealing, 48°C, 30 Sek.; Verlängerung, 68°C, 3 Min.). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen BglII/BamHI verdaut und in den Expressionsvektor pGEX2T kloniert.

Für die C-terminale Deletionsvariante 1-517 wurde zusätzlich mit den Restriktionsenzymen SpeI/EcoRI verdaut. Die verkürzten Fragmente wurden mit DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment aufgefüllt und religiert.

Nach Sequenzierung wurde die DNA-Sequenz des Fragmentes 1-546 bestimmt. Dabei wurde folgende DNA-Sequenz ermittelt:

```

ATG AAC TTA GTT AAC AAA GCC CAA TTA CAA AAA ATG GTA TAT GTA AAA
TTT CGT ATT CAA GAA GAT GAG TAC GTA GCA ATA TTA AAT GCT CTA GAA
GAA TAT CAC AAC ATG TCA GAA AGT AGT GTA GTT GAA AAG TAT TTA AAA
TTA AAG GAT ATA AAT AAT CTC ACA GAT AAT TAC CTG AAC ACA TAT AAT
AAA TCT GGA AGG AAT AAA GCC TTA AAA AAA TTT AAA GAA TAT CTA AAT
ATG GAA GTA TTA GAG CTA AAA AAT AAT AGT CTA ACT CCA GTC GAA AAA
AAT TTA CAT TTT ATA TGG ATT GGA GGA CAA ATA AAT GAT ACC GCT ATC
AAC TAT ATA AAT CAA TGG AAA GAT GTA AAT AGC GAT TAT ACA GTT AAA
GTT TTT TAT GAT AGT AAT GCA TTT TTG ATA AAT ACA TTA AAG AAA ACT
ATT GTT GAG TCA GCA ACA AAT AAT ACT CTT GAG TCA TTT AGA GAA AAC
TTA AAT GAC CCT GAA TTC GAT TAT AAT AAA TTT TAT AGA AAA CGT ATG
GAA ATA ATA TAT GAT AAA CAA AAA CAT TTT ATA GAT TAT TAT AAG TCT
CAG ATA GAA GAG AAT CCT GAA TTT ATA ATT GAT AAT ATT ATA AAA ACA
TAT CTC TCA AAT GAG TAT TCA AAA GAC CTA GAA GCC CTT AAT AAG TAT
ATT GAA GAA TCT TTA AAT AAA ATT ACT GCT AAT AAT GGT AAT GAT ATC
AGA AAT CTA GAA AAA TTT GCT GAT GAG GAT TTG GTA AGA TTA TAT AAT
CAA GAA TTA GTA GAA AGA TGG AAT TTG GCT GCT GCT TCT GAT ATA TTA
CGA ATA TCT ATG TTA AAA GAA GAT GGT GGT GTA TAT TTA GAT GTT GAC
ATG TTA CCA GGT ATA CAA CCA GAT TTA TTT AAA TCT ATA AAC AAG CTA
GAT TCG ATA ACA AAT ACA AGT TGG GAA ATG ATA AAG TTA GAG GCT ATC
ATG AAA TAT AAG GAA TAT ATA CCA GGG TAT ACG TCA AAG AAT TTT GAC
ATG TTA GAT GAA GAA GTT CAA CGC AGT TTT GAA TCT GCT TTA AGT TCT
AAA TCA GAT AAG TCA GAA ATT TTT TTG CCA CTT GAT GAT ATA AAA GTA
TCC CCG TTA GAA GTA AAA ATT GCA TTT GCC AAT AAC TCT GTT ATA AAT
CAA GCC TTA ATT TCT TTA AAA GAT TCC TAT TGT AGT GAT TTA GTA ATA
AAT CAA ATT AAA AAT AGA TAT AAA ATC TTG AAC GAC AAC TTA AAT CCA
TCC ATT AAT GAA GGT ACT GAC TTT AAT ACT ACA ATG AAA ATT TTT AGT
GAC AAA TTA GCA TCT ATT TCT AAT GAA GAT AAT ATG TTG TTT ATG ATA
AAA ATT ACA AAT TAT TTA AAA GTT GGA TTT GCT CCA GAT GTT AGA AGT
ACT ATT AAC TTA AGT GGA CCT GGA GTA TAT ACA GGA GCT TAT CAA GAT
TTG TTA ATG TTT AAA GAT AAT AGT ACA AAT ATT CAT TTA CTA GAA CCT
GAG TTA AGA AAT TTT GAG TTT CCT AAA ACT AAA ATT TCT CAA TTA ACA
GAA CAG GAA ATA ACT AGT TTA TGG TCA TTT AAC CAA GCA AGA GCA AAG
TCT CAA TTT GAA GAA TAT AAA AAA GGT TAT TTT GAA GGT GCA CTT GGA
GAA GAT

```

## Beispiel 2

Es wurde die Glucosyltransferase-Aktivität des Holoenzym verglichen mit der des erfindungsgemäßen Fragments (AS 1-546) und mit der des am C-Terminus deletierten Fragments mit den Aminosäuren 1-517.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu wurde jeweils 1 µg Ras mit dem Holoenzym (schwarz ausgefülltes Dreieck [▲]), gereinigtem N-terminalen Toxinfragment mit den Aminosäuren 1-546, dargestellt als schwarz ausgefülltes Quadrat [■], und Deletionsfragment mit den Aminosäuren 1-517 (schwarz ausgefüllte Kreise [●]) inkubiert. Eingesetzt wurden jeweils 1 nM des Toxins. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von UDP-[<sup>14</sup>C]-Glucose (10 µM) für die angegebene Zeit. Dann wurden die markierten Proteine mit SDS PAGE und Phosphorbild darstellung analysiert. Fig. 1 zeigt, daß das erfindungsgemäße Fragment eine höhere Aktivität aufweist als das Holotoxin. Die Aktivität ist bei dem weiterdeletierten Fragment (1-517) nahezu vollständig verlorengegangen.

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## ANMELDER:

- (A) NAME: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- (B) STRASSE: Werthmannplatz
- (C) ORT: Freiburg
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 79098

## ANMELDETITEL:

Toxikologisch aktive Fragmente des letalen Toxins  
von Clostridium sordellii und deren Verwendung in  
Immuntoxinen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 546 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (v) ART DES FRAGMENTS: inneres

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Asn Leu Val Asn Lys Ala Gln Leu Gln Lys Met Val Tyr Val Lys  
 1 5 10 15

Phe Arg Ile Gln Glu Asp Glu Tyr Val Ala Ile Leu Asn Ala Leu Glu  
 20 25 30

Glu Tyr His Asn Met Ser Glu Ser Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Lys  
 35 40 45

Leu Lys Asp Ile Asn Asn Leu Thr Asp Asn Tyr Leu Asn Thr Tyr Lys  
 50 55 60

Lys Ser Gly Arg Asn Lys Ala Leu Lys Lys Phe Lys Glu Tyr Leu Thr  
 65 70 75 80

Met Glu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Ser Leu Thr Pro Val Glu Lys  
 85 90 95

Asn Leu His Phe Ile Trp Ile Gly Gly Gln Ile Asn Asp Thr Ala Ile  
 100 105 110

Asn Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Val Asn Ser Asp Tyr Thr Val Lys  
 115 120 125

Val Phe Tyr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Ile Asn Thr Leu Lys Lys Thr  
 130 135 140

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



# DE 198 02 569 A 1

Gln Ala Leu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Tyr Cys Ser Asp Leu Val Ile  
385 390 395 400

Asn Gln Ile Lys Asn Arg Tyr Lys Ile Leu Asn Asp Asn Leu Asn Pro  
405 410 415

Ser Ile Asn Glu Gly Thr Asp Phe Asn Thr Thr Met Lys Ile Phe Ser  
420 425 430

Asp Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Glu Asp Asn Met Met Phe Met Ile  
435 440 445

Lys Ile Thr Asn Tyr Leu Lys Asn Gly Phe Ala Pro Asp Val Arg Ser  
450 455 460

Thr Ile Asn Leu Ser Gly Pro Gly Val Tyr Thr Gly Ala Tyr Gln Asp  
465 470 475 480

Leu Leu Met Phe Lys Asp Asn Ser Thr Asn Ile His Leu Leu Glu Pro  
485 490 495

Glu Leu Arg Asn Phe Glu Phe Pro Lys Thr Lys Ile Ser Gln Leu Thr  
500 505 510

Glu Gln Glu Ile Arg Ser Leu Trp Ser Phe Asn Gln Ala Arg Ala Lys  
515 520 525

Ser Gln Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Gly Tyr Phe Glu Gly Ala Leu Gly  
530 535 540

Glu Asp  
545

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

5 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

10 (C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

20 AGATCTATGA ACTTAGTTAA CAAAGCC

27

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

30 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

35 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45 GGATCCGAAC CTTATCCTAA ATCC

24

50

55

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1638 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGAACCTTAG TTAACAAAGC CCAATTACAA AAAATGGTAT ATGTAAAATT TCGTATTCAA 60 20  
 GAAGATGAGT ACGTAGCAAT ATTAATGCT CTAGAAGAAT ATCACAACAT GTCAGAAAGT 120  
 AGTGTAGTTG AAAAGTATTT AAAATTAAAG GATATAATA ATCTCACAGA TAATTACCTG 180 25  
 AACACATATA AAAAATCTGG AAGGAATAAA GCCTTAAAAA AATTTAAAGA ATATCTAACT 240 30  
 ATGGAAGTAT TAGAGCTAAA AAATAATAGT CTAACCTCAG TCGAAAAAAA TTTACATTTT 300  
 ATATGGATTG GAGGACAAAT AAATGATACC GCTATCAACT ATATAATCA ATGGAAGAT 360 35  
 GTAAATAGCG ATTATACAGT TAAAGTTTT TATGATAGTA ATGCATTTT GATAAATACA 420  
 TTAAAGAAAA CTATTGTTGA GTCAGCAACA AATAATACTC TTGAGTCATT TAGAGAAAAC 480 40  
 TTAAATGACC CTGAATTCGA TTATAATAAA TTTTATAGAA AACGTATGGA AATAATATAT 540  
 GATAAACAAA AACATTTTAT AGATTATTAT AAGTCTCAGA TAGAAGAGAA TCCTGAATTT 600 45  
 ATAATTGATA ATATTATAAA AACATATCTC TCAAATGAGT ATTCAAAAGA CCTAGAAGCC 660 50  
 CTTAATAAGT ATATTGAAGA ATCTTTAAAT AAAATTACTG CTAATAATGG TAATGATATC 720  
 AGAAATCTAG AAAAATTTGC TGATGAGGAT TTGGTAAGAT TATATAATCA AGAATTAGTA 780 55  
 GAAAGATGGA ATTTGGCTGC TGCTTCTGAT ATATTACGAA TATCTATGTT AAAAGAAGAT 840 60  
 65

	GGTGGTGTAT ATTTAGATGT TGACATGTTA CCAGGTATAC AACCAGATTT ATTTAAATCT	900
5	ATAACAAGC CTGATTGAT AACAATACA AGTTGGGAAA TGATAAAGTT AGAGGCTATA	960
	ATGAAATATA AGGAATATAT ACCAGGGTAT ACGTCAARGA ATTTGACAT GTTAGATGAA	1020
10	GAAGTTCAAC GCAGTTTTGA ATCTGCTTTA AGTTCTAAAT CAGATAAGTC AGAAATTTTT	1080
	TTGCCACTTG ATGATATAAA AGTATCCCG TTAGAAGTAA AAATTGCATT TGCCAATAAC	1140
15	TCTGTTATAA ATCAAGCCTT AATTTCTTTA AAAGATTCCT ATTGTAGTGA TTTAGTAATA	1200
	AATCAAATTA AAAATAGATA TAAATCTTG AACGACAACT TAAATCCATC CATTAATGAA	1260
20	GGTACTGACT TTAATACTAC AATGAAAATT TTTAGTGACA AATTAGCATC TATTCTAAT	1320
25	GAAGATAATA TGATGTTTAT GATAAAAATT ACAAAATTAT TAAAGTTGG ATTGCTCCA	1380
	GATGTTAGAA GTACTATTAA CTTAAGTGGG CTGGAGTAT ATACAGGAGC TTATCAAGAT	1440
30	TTGTTAATGT TTAAGATAA TAGTACAAAT ATTCATTTAC TAGAACCTGA GTTAAGAAAT	1500
	TTTGAGTTTC CTAAACTAA AATTTCTCAA TTAACAGAAC AGGAAATAAC TAGTTTATGG	1560
35	TCATTTAACC AAGCAAGAGC CAAGTCTCAA TTTGAAGAAT ATAAAAAAGG TTATTTTGAA	1620
40	GGTGCACTTG GAGAAGAT	1638

#### Patentansprüche

- 45 1. Fragment des lethalen Toxins von Clostridium, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 oder eine hierzu homologe Sequenz aufweist, wobei die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 80% beträgt.
2. Fragment gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 90% beträgt.
- 50 3. Fragment gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 95% beträgt.
4. Immunotoxin, **dadurch gekennzeichnet**, daß es
  - a) ein Fragment gemäß einem der Ansprüche 1-3 und
  - b) eine Zellbindungskomponente
- 55 aufweist.
5. Immunotoxin gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellbindungskomponente (b) ein Antikörper oder ein Teil davon ist, der spezifisch an eine Zielzelle bindet.
6. Immunotoxin gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellbindungskomponente (b) ein Ligand ist, der spezifisch an einen Rezeptor der Zielzelle binden kann.
- 60 7. Immunotoxin gemäß Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei der Zielzelle um eine Tumorzelle handelt.
8. Immunotoxin nach einem der Ansprüche 4-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weiterhin
  - c) ein Transportsystem
- 65 aufweist.
9. Immunotoxin nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Transportsystem die Translokationsdomäne des Pseudomonas Exotoxins A ist.
10. Immunotoxin nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Transportsystem die Translokationsdomäne des C2-Toxins von Clostridium ist.

11. Verwendung eines Fragments gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 als zielzellspezifisches Toxin.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

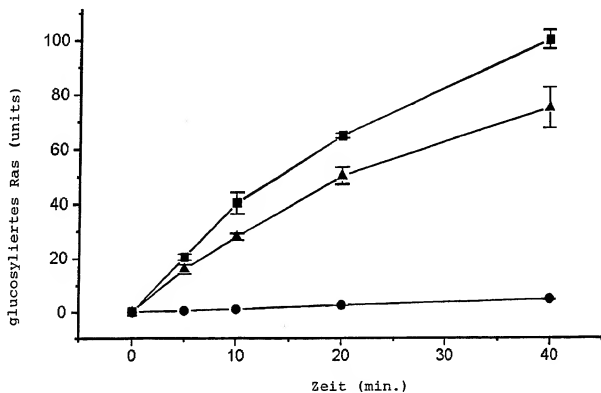


Fig. 1